

Abnormalities in cardiac α_1 -adrenoceptor and its signal transduction in streptozocin-induced diabetic rats

著者	田中 逸
発行年	1992-12-18
その他の言語のタイトル	ストレプトゾシン誘発糖尿病ラット心臓の α_1 -アドレナリン受容体とそのシグナル伝達における異常 ストレプトゾシン ユウハツ トウニョウビョウ ラット シンゾウ ノ α_1 アドレナリン ジュヨウタイト ソノ シグナル デンタツ ニ オケル イジョウ
URL	http://hdl.handle.net/10422/1922

氏名・(本籍)	田 中 逸 (京都府)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	博士 (論) 第116号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成4年12月18日
学位論文題目	Abnormalities in cardiac α_1 -adrenoceptor and its signal transduction in streptozocin-induced diabetic rats (ストレプトゾシン誘発糖尿病ラット心臓の α_1 -アドレナリン受容体とその シグナル伝達における異常)
審 査 委 員	主査 教授 木之下 正 彦 副査 教授 戸 田 昇 副査 教授 繁 田 幸 男

論 文 内 容 要 旨

[目 的]

糖尿病に起因する心機能障害の機序についてはいまだ不明な点が多い。近年、心筋 α_1 -アドレナリン受容体 (以下、 α_1 -受容体) を介するシグナル伝達機構の障害がその一因と推測されている。しかし、糖尿病心筋における細胞表面の α_1 -受容体数の変化や、細胞内シグナル伝達の障害の臨床的意義については不明な点が多い。そこで本研究では、糖尿病心筋における細胞表面の α_1 -受容体シグナル伝達機構の障害およびその機序を明らかにする目的で、①ストレプトゾシン誘発糖尿病ラットを用いて、単離心筋細胞表面の α_1 -受容体数、心室組織イノシトール1、4、5-3リン酸 (以下、IP₃)、心室組織プロテインキナーゼC活性 (以下PKC-活性) を検討し、②上記指標におけるインスリン治療の効果を検討し、さらに③フォルボールエステル刺激による正常ラット心筋のPKC-活性亢進が、 α_1 -受容体シグナルにおよぼす影響を検討した。

[方 法]

1) 糖尿病モデル動物

6週齢SD雄性ラット (150~170g) にストレプトゾシン (STZ) 60mg/kg静注により糖尿病ラットを作成して糖尿病群とし、緩衝液のみを静注したものを対照群とした。糖尿病ラットの一部はSTZ-静注2週後より、インスリン治療 (6単位/日、皮下注) を4週間施行し、インスリン治療群とした。各群とも静注6週後に、以下の実験に供した。

2) 単離心筋細胞 α_1 -受容体数の検討

コラゲナーゼ灌流とパーコール密度勾配により単離心筋細胞を採取後、親水性 α_1 -選択制拮抗剤 [³H] bunazosinを用いて、細胞表面における α_1 -受容体結合能実験を行い、受容体数と受容体親和性をScatchard解析にて検討した。

3) 心筋組織IP₃蓄積量の測定

α_1 -受容体刺激による心筋組織IP₃を測定するため、LiCl (20mM) 含有緩衝液にて灌流後、prop ranolol (10 μ M)、LiCl (20mM) 存在下に、norepinephrine (NE、10 μ M) 含有緩衝液にて0~60秒間灌流刺激し、過塩素酸にてIP₃を抽出した。IP₃の測定は、radio-receptor法を応用したIP₃-アッセイキット (Amersham) にて行った。

4) 心筋組織PKC-活性の測定

心筋組織ホモジェネートから超遠心 (105,000g) にて、細胞質分画と膜分画を各々採取し、セルロースカラムを用いて部分精製した。PKC-活性の測定は合成基質のリン酸化を応用したPKC-アッセイキット (Amersham) を用いて行った。

5) PKC-活性化が α_1 -受容体シグナルにおよぼす影響

PKC-活性を亢進させるため、正常ラット (16週齢) 摘出心臓に、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA、1 μ M) 含有緩衝液を30分間灌流刺激したものをTPA-処置群とし、緩衝液のみ灌流したものを対照群とした。両群を用いて、上記1~4の実験を行った。

[結 果]

糖尿病群の体重、心室重量は各々対照群に比して、47%、34%低下 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.01$) し、血糖値は6倍上昇 ($P < 0.01$) し、血漿インスリン濃度は84%低下 ($P < 0.01$) した。インスリン治療群では、血漿インスリン濃度は正常群に比して上昇 (71%、 $P < 0.01$) したが、体重、心室重量、血糖値は完全に正常化した。単離心筋細胞表面における α_1 -受容体数は糖尿病群では対照群に比べて45%減少 ($P < 0.02$) していたが、親和性には差異を認めなかった。心室組織IP₃含量は基礎状態では差を認めなかったが、NE刺激時の最大IP₃含量は糖尿病群で対照群に比べて34%低下 ($P < 0.01$) した。糖尿病群の心室組織PKC-活性は対照群に比し、膜分画で141% ($P < 0.05$)、細胞質分画で198% ($P < 0.01$) に増加した。糖尿病ラット心筋に認められたこれらの異常は、インスリン治療により有意に改善し、膜分画PKC-活性が対照群よりもさらに低下 (44%、 $P < 0.05$) した点を除くと完全に正常化した。PKC-活性を短期的に亢進させた正常ラットTPA-処置群では、対照群に比較して α_1 -受容体数は19%減少 ($P < 0.02$) し、同時にNE刺激時の心室組織最大IP₃含量も対照群に比し、21%低下 ($P < 0.02$) した。

[考 察]

糖尿病群に認められた、 α_1 -受容体数の低下、受容体刺激時のIP₃産生反応の低下、PKC-活性の亢進はいずれも、インスリン治療ではほぼ正常化したことから、糖尿病に特異的な病態と考えられた。既に、平滑筋細胞や肝細胞では、PKC-活性の亢進が α_1 -受容体を介するシグナル伝達に対して抑制的に作用することが知られているが、心筋細胞の α_1 -受容体シグナル伝達の調節におけるPKCの関与についてはいまだ不明である。今回の研究において、TPA刺激により短期的にPKC-活性を亢進させると、 α_1 -受容体とIP₃産生反応の低下が認められた点、および糖尿病ラット心筋ではPKC-活性が亢進している点を考え合わせると、糖尿病ラット心筋における α_1 -受容体の障害には、少なくともPKC-活性の亢進が関与している可能性が示唆された。

[結 論]

糖尿病ラット心筋における、 α_1 -受容体数、およびそのシグナル伝達は障害されており、このことが糖尿病における心機能障害の一因となっている可能性が示唆された。糖尿病ラット心筋におけるこの障害の機序として、PKC-活性の亢進が関与している可能性が示唆された。

学位論文審査の結果の要旨

本研究は糖尿病性心機能障害の一因として、 α_1 -アドレナリン受容体を介するシグナル伝達機構

の障害が存在するか否か、存在するとすればその機序はどうかを解明するため、ストレプトゾシン誘発糖尿病ラット心筋を用いて実験を行い、以下の結果を得た。

- 1) 糖尿病ラットでは対照ラットに比べて、心室筋細胞表面の α_1 -受容体数、および β 遮断剤プロプラノロール存在下のノルアドレナリン灌流刺激による心室筋イノシトール1、4、5-3リン酸(IP_3)産生反応はいずれも低下していた。これらの異常はインスリン治療にて正常化した。
- 2) 糖尿病ラット心室筋のプロテインキナーゼC(PKC)の活性は細胞質分画、膜分画ともに亢進しており、この亢進はインスリン治療にて改善した。
- 3) 正常ラット心室筋のPKCをフォルボールエステル刺激によって活性化すると、心室筋細胞表面の α_1 -受容体数、およびプロプラノロール存在下のノルアドレナリン灌流刺激による心室筋の IP_3 産生反応は、いずれも低下した。

以上、糖尿病ラット心筋では α_1 -受容体数の減少、および同受容体刺激に伴うセカンドメッセンジャー(IP_3)の産生反応の低下を認めることから、 α_1 -受容体シグナル伝達機構の障害が結論される。その機序として、PKC-活性亢進による受容体脱感作機構の関与している可能性が示唆された。

本研究はヒトの糖尿病性心機能障害の発症機序を明らかにする上で、貴重なデータを提供したものであるとして高く評価される。以上より、本研究は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。